



**Avaliação da Expressão de Genes *nif* e outros Envolvidos  
no Processo de FBN: Proposta de um Modelo da Interação  
Bactéria - Planta**



---

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Agrobiologia**

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

***República Federativa do Brasil***

***Presidente***

*Fernando Henrique Cardoso*

***Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

***Ministro***

*Marcus Vinicius Pratine de Moraes*

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa***

***Diretor Presidente***

*Alberto Duque Portugal*

***Diretores***

*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

***Embrapa Agrobiologia***

***Chefe Geral***

*Maria Cristina Prata Neves*

***Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento***

*Sebastião Manhães Souto*

***Chefe Adjunto Administrativo***

*Vanderlei Pinto*

*DOCUMENTO Nº 113*

*ISSN 1517-8498*

*Julho 2000*

**Avaliação da Expressão de Genes *nif* e outros Envolvidos  
no Processo de FBN: Proposta de um Modelo da Interação  
Bactéria - Planta**

Kátia Regina dos Santos Teixeira

*Seropédica – RJ*

*2000*

*Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à*

**Embrapa Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

**Expediente:**

Revisor e/ou ad hoc: Segundo Urquiaga

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix  
e/ou Sérgio Alexandre Lima

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

TEIXEIRA, K.R. dos S. **Avaliação da expressão de genes *nif* e outros envolvidos no processo de FBN: Proposta de um modelo de estudo da interação Bactéria-Planta.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, jul. 2000 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 113).

ISSN 0104-6187

1. (Palavras-chaves: Biblioteca). I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD (Biblioteca)

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>14</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>

# Avaliação da Expressão de Genes *nif* e outros Envolvidos no Processo de FBN: Proposta de um Modelo da Interação Bactéria - Planta

Kátia Regina dos Santos Teixeira<sup>1</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada et al., 1997, 1998), nova classificação de *A. diazotrophicus*, é um dos diversos microrganismos associados à cultura da cana-de-açúcar. Entretanto, o caráter endofítico que lhe tem sido atribuído e o alto número a partir do qual tem sido encontrado ( $10^6$  céls./g de peso fresco da planta) têm levado diversos autores a considerarem este diazotrofo como um dos principais responsáveis pelo balanço positivo de N no sistema solo/planta associado a esta cultura. Durante os estudos de Cojho et al. (1993), apesar de ter sido observado aumento na biomassa da levedura co-cultivada com *G. diazotrophicus*, não ficou claro se o N suprido para a levedura foi derivado diretamente da fixação de nitrogênio pela bactéria, através da excreção do excesso de N, ou se através de decomposição da matéria orgânica após a morte celular do diazotrofo.

Por outro lado, foi observado que bactérias fixadoras de nitrogênio, e também consideradas endofíticas, do Gênero *Azoarcus* apresentaram indução de complexo de membranas intracitoplasmáticas denominadas diazossomas, durante co-cultivo com fungo isolado a partir da rizosfera de “Kallar-grass” em condições de fixação de nitrogênio (Hurek et al., 1995). Além da alteração morfológica os autores observaram, através de estudos da expressão da nitrogenase e proteínas totais, que a Fe-proteína ou componente II da nitrogenase encontra-se associada a este

---

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970, Seropédica-RJ.

complexo de membranas e que a alteração do conteúdo de proteínas totais é resultante de uma expressão diferencial de genes. Segundo Hurek et al. (1995) esta expressão diferencial de genes é forte evidência de que outros genes podem estar envolvidos neste mecanismo de interação associativa onde parte do N-fixado é tornado disponível para o outro microrganismo, visto que genes envolvidos na biossíntese e ativação da nitrogenase não são os únicos responsáveis pela alteração do conteúdo protéico de acordo com os resultados obtidos. Na associação leguminosae/*Rhizobium*, a assimilação da amônia, inclusive a derivada da FBN, é feita pela via GS / GOGAT (glutamina sintetase / glutamato sintase) e neste caso, o nitrogênio não é fator limitante da expressão da FBN simbiótica. Portanto, considerando que foi verificado o aumento de atividade da enzima GS em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* (Dados de Relatório do projeto nº 62.0512/94.6 PADCT II / SBIO, 1996), torna-se essencial esclarecer o processo envolvido na expressão da FBN, principalmente durante o processo de interação entre *G. diazotrophicus* e a planta.

Desde o início da década de 70, quando houve a redescoberta da FBN associada principalmente a gramíneas de importância econômica, diversos grupos de pesquisadores de todo o mundo têm investido no estudo da regulação e expressão dos genes nif. Entretanto estes estudos têm se limitado a avaliação "in vivo" ou "in vitro" sem que haja interferência de outros fatores que possam derivar da interação entre estes diazotrofos e outro organismo. Cohjo et al. (1993), em estudos preliminares realizados durante o início da década de 90, propuseram avaliar durante co-cultivo a capacidade de um diazotrofo em condições de fixação de nitrogênio suprir o nitrogênio necessário para o crescimento da levedura, organismo utilizado como modelo no estudo da contribuição da FBN na interação bactéria-planta. Apesar do amplo conhecimento existente hoje em relação ao envolvimento de outros genes na interação bactéria-planta no caso de bactéria do grupo de rizóbios e leguminosas, poucos estudos têm sido realizados com o intuito de estudar a indução e expressão de genes específicos durante o processo de interação bactéria-planta no caso da interação de diazotrofos não-simbióticos e endofíticos com outros grupos vegetais.

Os experimentos realizados visaram o estudo de fatores envolvidos no processo de fixação de nitrogênio de *G. diazotrophicus* em presença de outro organismo, uma levedura, que permitam estabelecer um modelo similar ao do sistema de interação envolvido no processo de FBN desse diazotrofo com a cana-de-açúcar.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Organismos utilizados e condições de cultivo.

Culturas de *Gluconacetobacter (Acetobacter) diazotrophicus* foram crescidas no meio mínimo LGI (Magalhães et al., 1983) contendo como fonte de carbono 5 g/L de glicose e, na presença de 10mM de NH<sub>4</sub>Cl em concentração de oxigênio atmosférica saturantes ou sob condições de fixação de nitrogênio (concentrações de oxigênio dissolvido controladas em aproximadamente 2-4%) e na presença de sais de amônia (1mM).

*Lipomyces spencermartinsiae* (nv classificação de *L. kononenkoe*) estirpe CBS 5608 e *Saccharomyces cerevisiae* mutante *gshA-2* (Mehdi & Penninckx, 1997) foram crescidas independentemente ou co-cultivadas com *G. diazotrophicus* nos mesmos meio e condições descritos anteriormente. O cultivo de *G. diazotrophicus* independente ou associado com *L. spencermartinsiae* ou *gshA-2* foi realizado na presença de eletrodos de oxigênio e pH na presença de meio LGI líquido em fermentador (Biostat M, GmBh). Durante o co-cultivo foram coletadas amostras para caracterizar as diversas etapas do crescimento do diazotrofo e organismo associado. Além disso foram avaliados o crescimento através da D.O, a capacidade de fixar nitrogênio através da redução de acetileno e a presença de N-excretado para o meio de cultivo através do método enzimático produzido pela Boehringer Mannheim. Também foram coletadas amostras para extração de RNA, proteínas e caracterização de possíveis alterações morfológicas através de técnicas de microscopia eletrônica.

### 2 - Avaliação de possíveis alterações morfológicas e estruturais derivadas da associação entre células de *G. diazotrophicus* com outros organismos.

Para avaliar alterações em células de *G. diazotrophicus* as amostras de células foram coletadas por centrifugação em tubos do tipo eppendorf e ressuspensas em tampão fosfato de potássio 25 mM pH6,8. Em seguida as células foram coletadas e ressuspensas em Fixador (Tampão fosfato contendo 2,5% de Glutaraldeído). A amostra no fixador foram armazenadas durante 12h em temperatura ambiente ou 24 h a 4°C. Posteriormente as células foram desidratadas pela lavagem em uma série de solução alcoólica (50% - 70% - 80% - 90% - 100%). Ao fim do processo de desidratação o pellet foi ressuspensado em resina LR White ("Medium grade" - SIGMA) e deixado durante 2 dias na geladeira e a polimerização ocorreu em estufa a 65°C durante no mínimo 12 horas.

Análises em microscopia óptica também foram realizadas para acompanhar o número de células durante o crescimento, principalmente durante o co-cultivo.

### 3 - Avaliação indireta e direta da indução de genes em *G. diazotrophicus*.

#### 3.1 - Avaliação de proteínas totais.

Para avaliar a possível indução de genes associados as condições de cultivo de *G. diazotrophicus* foram coletadas amostras em diferentes tempos para caracterização do conteúdo protéico derivado de suas células quando submetidas a condições de fixação de nitrogênio em culturas puras ou em associação com outro organismo.

Volume equivalente a 4 ml de células foram coletadas por centrifugação e concentradas 10x em tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pH8,0. As amostras foram congeladas e posteriormente serão acrescidas com 1 volume de tampão de extração (9,92mM de Tris-HCl, 76,8 mM de glicina, 10 M de urea, 2% de SDS e 4% de -mercaptoetanol) e submetidas a 10 ciclos de incubação a 55°C seguido por resfriamento brusco em N-liquido. Ao fim do processo de rompimento das células, o extrato será mantido em gelo durante 1 hora antes de ser centrifugado para separação das porções de proteínas solúveis e não-solúveis em água.

A avaliação das proteínas totais será realizado em sistemas eletroforéticos do tipo bidimensional em IEF (Iso eletro-focusing) e SDS-Page. Controles das proteínas totais derivadas dos organismos associados, no caso a levedura, serão realizados.

Esta etapa do projeto está dependente da compra do equipamento já previsto pela agência financiadora da parte Alemã no convênio de Cooperação Internacional CNPq/DRL.

### 3.2- Avaliação da indução em *G. diazotrophicus* da expressão de genes específicos durante associação com outro organismo.

Foram aplicados dois protocolos para a extração de RNA total, a partir de células de *G. diazotrophicus* e das Leveduras, nas diversas condições de cultivo e associação.

O primeiro protocolo foi o fornecido pelo fabricante do Kit RNeasy (QIAGEN) e se baseou no uso de uma coluna para purificação do RNA a partir de um extrato bruto de ácidos nucléicos. Alternativamente foi realizado um outro protocolo recomendado para a extração de RNA em Leveduras e que usa um tampão de acetato de sódio 50 mM e EDTA 50 mM pH 5,2 (AE Buffer) para ressuspender as células. Durante a etapa de lise foram acrescentados SDS na concentração final de 1% e os tubos contendo as células em suspensão foram submetidos a agitação rápida em vórtex. O extrato bruto foi desproteínizado através de uma extração em fenol (equilibrado em AE buffer) e incubado a 65°C durante 4 minutos. Ao fim da incubação o extrato foi resfriado em banho de gelo seco até a formação de cristais de fenol. As fases foram separadas por centrifugação durante 2 minutos em velocidade máxima da microcentrífuga (12 – 14 krpm). A fase aquosa foi coletada, transferida para outro tubo estéril e re-extraída com fenol: clorofórmio (1:1). Por último foi realizada uma extração com clorofórmio: álcool isoamílico (1:1). Após estas extrações, foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e o ácido nucléico foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol (RNase free) e incubação durante uma noite a –20°C.

Em ambos os casos foram utilizados reagentes RNase-free e as soluções foram preparadas com H<sub>2</sub>O tratada com 0,1% de DEPC. Toda a vidraria e espátulas de metal foram previamente esterilizadas em estufa a 190 °C durante no mínimo 4 horas antes do uso. Utensílios plásticos resistentes a autoclave foram tratados com uma solução de peróxido de oxigênio 3% e posteriormente autoclavados 2 vezes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hipótese de que a associação entre um organismo diazotrófico e uma célula eucariótica possa resultar em uma interação que favoreça o processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), tornando este elemento disponível para organismos que não apresentam esta capacidade, foi testada. A estratégia proposta inicialmente previa a avaliação de indução de genes ou expressão diferencial de proteínas durante o co-cultivo de microrganismo fixador de nitrogênio e um eucarioto como modelo representativo do processo que ocorre durante a interação entre a bactéria e a planta. Considerando que o processo de FBN requer condições controladas de oxigênio e que a presença de nitrogênio disponível no meio é um fator que regula a expressão dos genes envolvidos no processo, os experimentos foram conduzidos em um fermentador no Laboratório do Dr. Istvan Fendrik na Universidade de Hannover – Alemanha.

Como controle foi realizado a curva de crescimento da estirpe mutante *gshA-2* de *S. cerevisiae*, a qual foi derivada de um estudo do papel de glutatona e - glutamiltanspeptidase no suprimento de fatores de crescimento em condição de limitação de nitrogênio (Mehdi & Penninckx, 1997), na presença de uma dose inicial de nitrogênio equivalente a 1mM de  $\text{NH}_4^+$ . Os resultados apresentados na figura 1 indicam que a levedura iniciou seu crescimento em fase exponencial após uma lag de aproximadamente 10 horas, tendo sido observado acúmulo de oxigênio dissolvido no meio entre o período de 31 e 47 h após o início da curva, além disso a quantidade de N disponível no meio detectado após 20 horas era de 6,9 M. Estes fatos, associados ao aumento observado no tempo de geração médio da fase logarítmica de 5,6 h para 57,4 h nas 19 horas seguintes sugerem que as células estavam limitadas em nitrogênio. Estes resultados são comparáveis com os descritos por Mehdi & Penninckx (1997) onde a estirpe mutante foi incapaz de produzir aumento da sua biomassa enquanto a selvagem apresentou duplicação nas primeiras 10 horas em condições de ausência de nitrogênio.

Estabelecido que esta levedura apresenta uma característica essencial para o estudo proposto, ou seja dependência do nitrogênio para sua sobrevivência, e que neste caso os resultados obtidos não seriam derivados de um metabolismo acessório de sobrevivência em condições de limitação de nitrogênio ela foi escolhida

como um dos organismos a ser co-cultivado com *G. diazotrophicus*. Além disso, a capacidade de usar glicose como fonte de carbono e tolerar acidez também foram fatores determinantes para o seu uso nos experimentos de co-cultivo.

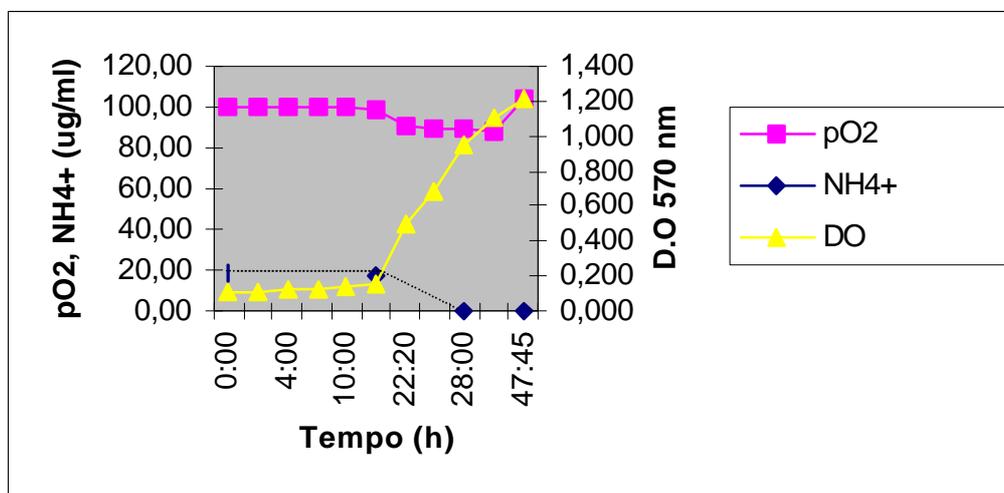


Figura 1 – Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* mutante *gshA-2* em condição de limitação de nitrogênio.

No caso da bactéria fixadora de nitrogênio *G. diazotrophicus* a curva de crescimento foi determinada visando repetir as condições da curva publicada anteriormente, exceto pelo uso do meio LGITA ou LGIM durante o crescimento do pré-inóculo como descrito por Stephan et al. (1991). A capacidade de *G. diazotrophicus* de apresentar uma alta taxa de respiração sem acúmulo de biomassa nas primeiras 10 horas de crescimento em presença de 5 g de glicose /L foi observada como anteriormente. Entretanto, nas várias tentativas de realizar a curva de crescimento em condições de fixação de nitrogênio (dados não apresentados) a bactéria não foi capaz de acumular biomassa após o consumo de grande parte da dose inicial de N fornecido ao meio de cultura. Este fato associado com a incapacidade de produzir etileno em diversas amostras submetidas ao método de redução de acetileno indicam que a bactéria não encontrou condições favoráveis para estabelecer o processo de fixação de nitrogênio. Uma outra observação realizada durante o experimento foi o alto consumo inicial do oxigênio dissolvido no meio. Este comportamento foi semelhante ao observado anteriormente por Stephan

et al. (1991) porém durante as próximas 3 horas houve uma tendência de acúmulo do oxigênio dissolvido tendo sido feito uma mistura de gases ( $N_2$  e ar) para evitar que o oxigênio em excesso atuasse como um inibidor do processo de FBN. Durante este período ainda houve acúmulo de biomassa no entanto o oxigênio dissolvido só pode ser controlado a um  $pO_2$  de 1,93% da concentração atmosférica de oxigênio (equivalente a 0,38% de oxigênio dissolvido) com o aumento do gás  $N_2$  na mistura. Porém, após 3 horas do ajuste da mistura de gases novamente foi observado aumento de oxigênio acumulado no meio enquanto que a biomassa não apresentou alteração. Deste ponto em diante foi observado um acúmulo de oxigênio crescente e a taxa de multiplicação tendeu a estabilizar como em um estágio de uma curva de crescimento onde existe alguma limitação de nutrientes.

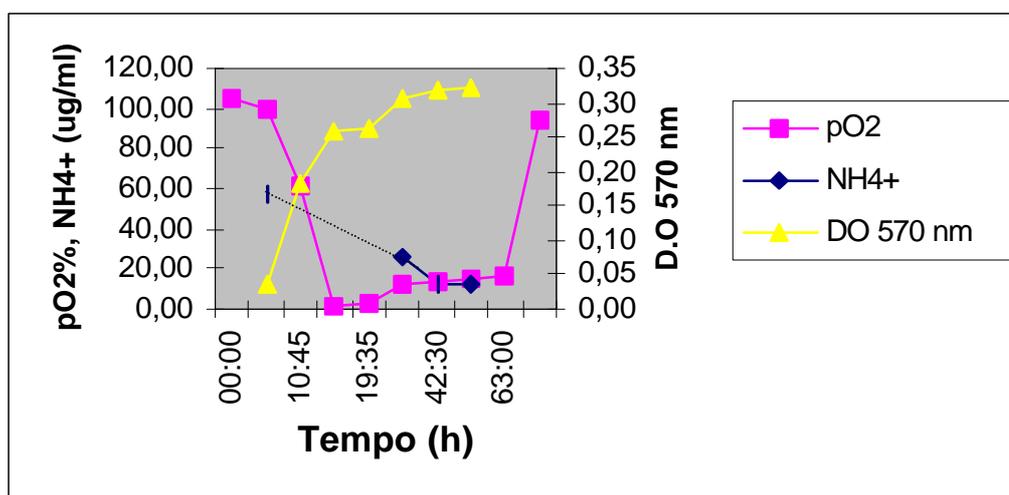


Figura 2 - Curva de crescimento de *G. diazotrophicus* em condição de limitação de nitrogênio.

Na expectativa que a presença de outro organismo fosse possível superar as limitações que não permitiram o estabelecimento da FBN nas condições experimentais testadas foi realizado simultaneamente o co-cultivo de *G. diazotrophicus* com as leveduras *S. cerevisiae gshA-2* e *L. spencermantinsiae* CBS5608. Os valores de D.O são representativos da biomassa de ambos organismos, tentativas de separá-los não foi bem sucedida tendo sido observado

sempre uma perda entre 50 a 70 % no valor de D.O após filtragem da bactéria em cultura pura em filtro millipore de 5 m. Na figura 3, está apresentado a curva de crescimento durante co-cultivo de *G. diazotrophicus* e *gshA-2*. O comportamento observado em relação ao acúmulo de oxigênio no meio foi semelhante ao observado anteriormente para ambas curvas de crescimento independentes desses organismos em condições de limitação de nitrogênio. Avaliações das células ao microscópio óptico revelou que no início da curva houve predominância do aumento do nº de células da bactéria até aproximadamente 20 horas de cultivo, porém este quadro foi revertido tendo sido observado que após 34 horas de cultivo a Levedura passou a predominar até o final do experimento. Esta sucessão pode também ser correlacionada com o tipo de curva apresentada onde pode se observar um período de transição. Outra observação foi a presença de células de levedura com áreas escuras cuja origem será confirmada através de cortes de blocos preparados para estudo mais detalhado em microscopia eletrônica. Não foi observado redução de acetileno nas diversas amostras coletadas durante a curva de crescimento, indicando que a condição não foi adequada para expressão da FBN por *G. diazotrophicus*.

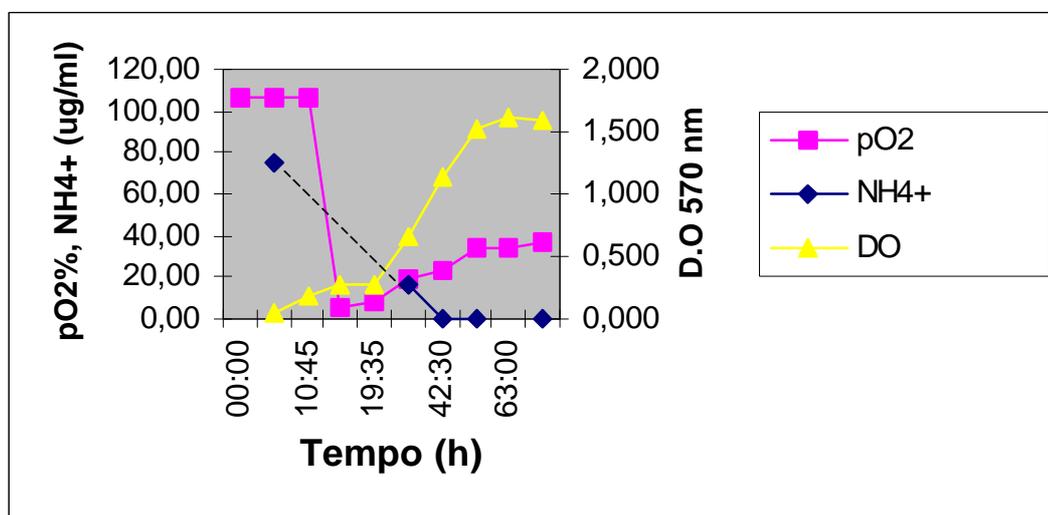


Figura 3 – Co-cultivo de *G. diazotrophicus* e *S. cerevisiae gshA-2* em condições de limitação de nitrogênio.

Considerando que Cohjo et al. (1993) utilizou a levedura *L. spencermartinsiae* nos seus experimentos de co-cultivo, foi também realizado o co-cultivo desse

organismo com *G. diazotrophicus*. O atual protocolo difere do anterior em relação ao uso de meio líquido e substituição do amido por glicose como fonte de carbono. Esperávamos com estas alterações podermos recuperar informações mais precisas do nº e viabilidade das células, excreção de amônia derivada da FBN para o meio e aplicar técnicas de extração de proteínas e ácidos nucleicos para avaliar o potencial de expressão diferencial de proteínas ou indução de genes.

Figura 4 – Co-cultivo de *G. diazotrophicus* com *L. spencermantinsiae* em condições de limitação de nitrogênio.

O comportamento desse co-cultivo em relação ao anterior foi semelhante ao observado durante as primeiras 62 horas, no entanto após este período ainda foi observado aumento na biomassa sugerindo um terceiro estágio de adaptação. Neste caso é importante ressaltar que a mutante *gshA-2* não é capaz de sobreviver em condições de limitação de nitrogênio enquanto a estirpe selvagem apresentou um aumento de até 3 vezes o valor da biomassa inicial (Mehdi & Penninckx, 1997). Este fato pode explicar a capacidade dessa outra levedura também ser capaz de aumentar a biomassa mesmo após o término de nitrogênio disponível no meio.

Em todas as curvas foram coletadas amostras para microscopia eletrônica, extração de proteínas e de RNA. As duas estratégias aplicadas para extração de RNA resultaram em uma extração pouco eficiente, com alto grau de degradação ou contaminação com DNA. Apesar de no Laboratório do Dr. Fendrik estar sendo utilizado com sucesso o kit RNeasy (Qiagen) para extração de RNA a partir de tecido vegetal, tentativas de isolar RNA a partir de bactérias já haviam sido realizadas porém o resultado da extração sempre indicou baixa eficiência no rendimento ou degradação do material. Apesar da maioria dos reagentes serem fornecidos em um Kit, na etapa de lise é requerido o uso de Lisozima em um tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>, neste caso é sugerido o uso de um inibidor de RNase o qual não foi utilizado pois o Laboratório não apresentava demanda deste reagente até o momento. O mesmo tipo de problema pode ter sido responsável pelo alto grau de degradação observado nas extrações realizadas pelo método de fenol descrito no manual publicado por Farrel Jr. (1993). Porém a eficiência da extração em duas das cinco amostras utilizadas foi bastante promissora porém ainda se observa contaminação de DNA e degradação

de RNA durante o processo de extração. No caso das proteínas, as amostras coletadas estão estocadas para análise caso haja demanda.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em todos os pontos abordados neste relatório é importante destacar que os experimentos realizados, apesar de não terem fornecido informações conclusivas sobre a questão levantada inicialmente, foram essenciais para obtenção de dados preliminares sobre o comportamento desses organismos os quais não foram observados durante os experimentos realizados por Cohjo et al. (1993). Certamente, uma nova estratégia deverá ser considerada durante a repetição de novos experimentos para elucidar esta questão.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHEMBERG, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p.341-346, 1993.

FARRELL Jr, R.E. **RNA Methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization**. San Diego: Academic press, 310p, 1993.

HUREK , T.; MONTAGU, M.V. ; KELLENBERG, E.; REINHOLD-HUREK, B. Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp. BH72. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 18, p.225-236, 1995.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.

MEHDI, K.; PENNINGKX, M. J. An important role for glutathione S-transferase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Oxford, v.143, p.1885-1889, 1997.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, p.67-72, 1991.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, p.1244-1251, 1997.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 61:1244-1251.(1997). *Validation list n° 64*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 48, p.327-328, 1998.